รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การหาเชื้อ *Vibrio* spp. ที่ก่อโรคในปลาเพาะเลี้ยง

Investigation of pathogenic *Vibrio* spp. in cultured fish

คณะนักวิจัย

ผศ.ดร.ณัฐวรรณ เสริมวิทยวงศ์

ผศ.ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาทร

ดร.จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2558 รหัสโครงการ SCI580246a

ชื่อชุดโครงการ

การศึกษาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ ที่มีผลต่อสุขภาพ

Study of health affected pathogenic bacteria isolated from various sources

ชื่อโครงการย่อย

1. การหาเชื้อ *Vibrio* spp. ที่ก่อโรคในปลาเพาะเลี้ยง
   Investigation of pathogenic *Vibrio* spp. in cultured fish
2. การเปรียบเทียบเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสในการจำแนกสายพันธุ์ของ *Vibrio cholerae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมในจังหวัดสงขลา
   Comparison of PCR-based techniques for typing of *Vibrio cholerae* strains isolated from clinical and environmental samples in Songkhla Province
3. การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ *Vibrio vulnificus* ที่แยกได้จากอาหารทะเล และผู้ป่วยโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา
   Characterization of *Vibrio vulnificus* isolated from seafood and clinical specimens using molecular techniques
4. ความชุกของเชื้อ Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) ในเนื้อสัตว์ค้าปลีก
   Prevalence of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in retailed meats
5. การตรวจหาเชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia* ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์
   Detection of *Stenotrophomonas maltophilia* in Songklanagarind Hospital
6. การแยกแยะสายพันธุ์และการตรวจหาเชื้อ *Clostridium difficile* ที่รวดเร็วทางอณูวิทยา
   Molecular genotyping and rapid detection of *Clostridium difficile*

คณะนักวิจัย

1. ผศ.ดร.ณัฐวรรณ เสริมวิทยวงศ์	ภาควิชาจุลชีววิทยา	คณะวิทยาศาสตร์
2. ผศ.ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาทร	ภาควิชาจุลชีววิทยา	คณะวิทยาศาสตร์
3. ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ	ภาควิชาจุลชีววิทยา	คณะวิทยาศาสตร
4. ผศ.ดร.ภารนัย สุขุมังกูร	ภาควิชาจุลชีววิทยา	คณะวิทยาศาสตร์
5. ดร.กาญจนา ศรีนิติวรวงศ์	ภาควิชาจุลชีววิทยา	คณะวิทยาศาสตร์
6. ดร.กมนนัทธ์ ศิงฆมานันท์	ภาควิชาชีวเวชศาสตร์	คณะแพทยศาสตร์

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	4
Abstract	5
บทคัดย่อ	6
บทนำ	7
วัตถุประสงค์	9
บทตรวจเอกสาร	10
วิธีการทดลอง	25
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	31
สรุปผลการทดลอง	43
เอกสารอ้างอิง	44
ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป	58
ภาคผนวก 1 นิพนธ์ต้นฉบับที่พร้อมส่งตีพิมพ์ (Manuscript)	59
ภาคผนวก 2 บทความวิจัยนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ (Proceedings)	88
ภาคผนวก 3 การเผยแพร่ผลงานในงานประชุมวิชาการ	96

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ตัวอย่างเชื้อ vibrios ที่สามารถก่อโรคในสัตว์ทะเลได้ 17

ตารางที่ 2 ตัวอย่างการนำเทคนิค DGGE มาใช้ในงานวิจัยด้านต่าง ๆ 22

ตารางที่ 3 Species-specific primers และสภาวะที่ใช้ในการทำ species-specific PCR 28

ตารางที่ 4 Primer และสภาวะที่ใช้ในการทำ AP-PCR 29

ตารางที่ 5 จำนวนและแหล่งที่มาของเชื้อ vibrios ที่ทำการศึกษา 31

ตารางที่ 6 การจัดกลุ่มเชื้อ vibrios สายพันธุ์มาตรฐานเมื่อศึกษาโดยเทคนิค DGGE 32

ตารางที่ 7 ผลการจำแนกเชื้อ *Vibrio* spp. ที่แยกได้จากน้ำและตะกอนดินโดยวิธีทางชีวเคมี 35

ตารางที่ 8 ผลการศึกษาความหลากหลายของเชื้อ vibrios ที่แยกได้จากตัวอย่างกุ้งขาวที่ เป็นโรค ปลาเพาะเลี้ยงชายฝั่งที่เป็นโรค และสิ่งแวดล้อมโดยเทคนิค DGGE และ species-specific PCR 38

ตารางที่ 9 ผลการระบุสายพันธุ์ของเชื้อ vibrios โดยวิธี DNA sequencing 39

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 DGGE marker 33

รูปที่ 2 ผลการทำ DGGE ของตัวอย่างเชื้อ *Vibrio* spp. ที่แยกได้จากน้ำ (W4-15) (ซ้าย) และดิน (S1-10) (ขวา) 36

รูปที่ 3 แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. alginolyticus* โดยเทคนิค AP-PCR 41

รูปที่ 4 Dendrogram จากแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. alginolyticus* โดยเทคนิค AP-PCR โดยใช้โปรแกรม bioprofile image analysis system (Vilber Lournat, france) 42

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้ให้การสนับสนุนด้านการวิจัย สถานที่ รวมถึงเครื่องมือที่จำเป็นสำหรับการวิจัย ขอขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชา เจ้าหน้าที่ และผู้ร่วมวิจัยทุกท่าน ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำตลอดการทำวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณ นางสาวกิตติยา คงกุล นักศึกษาปริญญาโทผู้ช่วยวิจัย ที่ขยันและอดทนในการทำวิจัยจนประสบความสำเร็จไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2558 (รหัสโครงการ SCI580246a) ที่ได้ให้การสนับสนุนด้านการเงิน ทำให้งานวิจัยสามารถดำเนินไปได้จนแล้วเสร็จตามวัตถุประสงค์ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เดชา เสริมวิทยวงศ์ ที่คอยให้คำแนะนำปรึกษา รวมถึงแก้ไขร่างรายงานฉบับสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณคุณแม่ที่คอยให้กำลังใจเสมอมา

Abstract

Vibrios are Gram-negative curved rod shape bacteria widespread in marine and estuarine environments. Many vibrios are serious pathogen for marine animal both cultured and nature. It can cause economic loss in aquaculture farms worldwide. From the study on standard strains of vibrios, we can classify them in to 8 groups for preparation of DGGE standard markers to evaluate the diversity of vibrios. In this study, total 347 isolates of vibrios isolated from diseased white shrimps (n=53), diseased cultured fish (n=241) and environments (n=53) were identified by DGGE and species-specific PCR. Four *Vibrio* species were commonly found in these samples including *V. parahaemolyticus* (81 isolates), *V. harveyi* (68 isolates), *V. vulnificus* (35 isolates) and *V. alginolyticus* (28 isolates). *V. parahaemolyticus* showed purple colonies on CHROMagar Vibrio, while *V. harveyi* showed two types of colony colors including small white and purple opaque edge colonies. *V .vulnificus* showed blue colonies and *V. alginolyticus* showed big white colonies, respectively. However, some vibrios and other bacteria demonstrated distinct DNA band size to the DGGE marker were species identified by DNA sequencing. Moreover, *V. alginolyticus* isolated from various sources were selected for DNA fingerprint study by AP-PCR. The results showed diverse DNA fingerprint patterns demonstrated a genetic heterogeneity of this bacterium.

บทคัดย่อ

เชื้อ vibrios เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน สามารถพบได้ทั่วไปในทะเลและปากแม่น้ำ เชื้อ vibrios หลายสปีชีส์เป็นเชื้อก่อโรคร้ายแรงทั้งในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยงและในธรรมชาติ เป็นสาเหตุให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วโลก จากการศึกษาเชื้อ vibrios สายพันธุ์มาตรฐาน สามารถจัดแบ่งเชื้อสำหรับเตรียมเป็น DGGE marker ได้ 8 กลุ่ม เพื่อใช้ในการประเมินความหลากหลายของเชื้อ vibrios โดยการศึกษาครั้งนี้สามารถแยกเชื้อ vibrios จำนวนทั้งสิ้น 347 ไอโซเลต ได้จากกุ้งขาวที่เป็นโรค (n=30) ปลาเพาะเลี้ยงชายฝั่งที่เป็นโรค (n=241) และจากสิ่งแวดล้อม (n=53) ทำการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยเทคนิค DGGE ร่วมกับ species-specific PCR พบว่า มีเชื้อ vibrios จำนวน 4 สายพันธุ์ที่สามารถแยกได้จากตัวอย่างมากที่สุด ได้แก่ เชื้อ *V. parahaemolyticus* (81 ไอโซเลต), *V. harveyi* (68 ไอโซเลต), *V. vulnificus* (35 ไอโซเลต) และ *V. alginolyticus* (28 ไอโซเลต) โดยเชื้อ *V. parahaemolyticus* ให้โคโลนีสีม่วง บนอาหาร CHROMagar Vibrio ในขณะที่ *V. harveyi* ให้โคโลนีได้ 2 สี คือ สีขาวขุ่น ขนาดเล็ก และสีม่วงขอบขาวขุ่น สำหรับเชื้อ *V. vulnificus* ให้โคโลนีสีฟ้า และเชื้อ *V. alginolyticus* ให้โคโลนีสีขาวขุ่น ขนาดใหญ่ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสามารถพบเชื้อ vibrios และแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ปรากฏตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอไม่ตรงกับ DGGE marker ซึ่งได้ทำการระบุสายพันธุ์ของเชื้อโดยวิธี DNA sequencing จากนั้นได้ทำการคัดเลือกเชื้อ *V. alginolyticus* ที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ มาทำการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยวิธี AP-PCR ผลการศึกษาพบว่ามีแตกต่างกันของลายพิมพ์ดีเอ็นเอในระดับสูง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียนี้